

学校编码: 10384
学号: 24520091153003

分类号_____密级_____
UDC_____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

乳铁蛋白对仔猪焦虑感和探索能力及海马 齿状回发育的影响

Effect of Lactoferrin on fear and
exploration to new environment in piglets and
development of dentate gyrus

刘 霓

指导教师姓名: 王 冰 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩 写 词 表	V
1 前言.....	1
1.1 乳铁蛋白	1
1.1.1 乳铁蛋白序列的特性.....	1
1.1.2 乳铁蛋白的分布.....	3
1.1.3 乳铁蛋白的生理功能.....	3
1.1.4 乳铁蛋白在生活中的应用.....	6
1.2 新生儿脑发育	7
1.2.1 大脑的结构与功能.....	7
1.2.2 主掌认知功能——海马.....	8
1.2.3 新生儿的大脑剧烈的变化.....	10
1.2.4 神经发生.....	12
1.2.5 营养对新生儿脑发育的影响.....	14
1.3 仔猪模型	15
1.3.1 猪—神经科学研究中的实验动物.....	15
1.3.2 新事物探索实验.....	16
1.3.3 旷场试验.....	16
1.3.4 影响仔猪 Open-field 实验的因素	17
1.4 研究目的	20
2 实验材料及方法	21
2.1 实验动物的饲养	21
2.2 动物的分组	21
2.3 标本取材	22

2.3.1 脑样本.....	22
2.3.2 血液样本采集.....	22
2.4 实验的主要试剂及仪器	22
2.4.1 主要试剂.....	22
2.4.2 主要仪器.....	23
2.5 体重的测量	23
2.6 旷场试验	24
2.6.1 实验场地.....	24
2.6.2 实验过程.....	25
2.6.3 观察指标.....	25
2.7 激素的测定	25
2.8 免疫荧光方法	26
2.8.1 玻片的制备.....	26
2.8.2 冰冻切片.....	26
2.8.3 免疫荧光染色.....	26
2.9 统计学处理	27
3 实验结果	28
3.1 乳铁蛋白与行为运动对仔猪的体重与脑重的影响	28
3.1.1 仔猪体重变化情况.....	28
3.1.2 仔猪脑重.....	30
3.2 乳铁蛋白对仔猪激素水平的影响	32
3.2.1 ACTH.....	32
3.2.2.Cortisol.....	32
3.3 乳铁蛋白对猪仔 Open-field test 的影响	34
3.3.1 仔猪行为检测.....	34
3.3.2 仔猪运动性和定位.....	35
3.3.3 仔猪探测新事物能力检测.....	40
3.3.4 猪仔对实验场地的适应性.....	43
3.4 乳铁蛋白对神经发育的影响	45

3.4.1 乳铁蛋白对神经元影响.....	45
3.4.2 乳铁蛋白对神经胶质细胞的影响.....	46
3.4.3 乳铁蛋白对未成熟细胞的影响.....	48
3.4.4 乳铁蛋白对神经发生的影响.....	50
4 结论与讨论	52
参 考 文 献	56
致 谢.....	65

Content

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Abbreviation.....	V
1Introduction.....	1
1.1Lactoferrin.....	1
1.1.1The characterastic sequence of lactoferrin.....	1
1.1.2The source of lactoferrin.....	3
1.1.3The biological function of lactoferrin.....	3
1.1.4The application of lactoferrin in life	6
1.2Brian development in the neonate.....	7
1.2.1The structure and function of the brain.....	7
1.2.2The key of cognitive function——hippucampus.....	8
1.2.3Brian development in neonates.....	10
1.2.4Neurogenesis.....	12
1.2.5The function of nutrition to brian development.....	14
1.3Piglets model.....	15
1.3.1Pig in neuroscience	15
1.3.2Novel objective test.....	16
1.3.3Open-field test.....	16
1.3.4The factors affecting the open-field test	17
1.4The aim of the research	20
2Macterials and method	21
2.1Animal feeding	21
2.2Animal grouping	21
2.3Sample collection.....	22
2.3.1Brain sample	22
2.3.2Blood sample	22

2.4 Main reagents and expriment apparatus.....	22
2.4.1 Main reagents.....	22
2.4.2 Main apparatus.....	23
2.5 Weighting.....	23
2.6 Open-field test	24
2.6.1 Arena.....	24
2.6.2 Procedure	25
2.6.3 Indexes	25
2.7 Dection of hormones	25
2.8 Immunohistology.....	26
2.8.1 Preparation for slices.....	26
2.8.2 Frozen section	26
2.8.3 Immunohistology	26
2.9 Statistics analysis.....	27
3 Result.....	28
3.1 The effect of lactogerrin on body and brain weight.....	28
3.1.1 Piglets'body weight	28
3.1.2 Piglets'brain weight	30
3.2 The effect of lactoferrin on hormones.....	32
3.2.1 ACTH.....	32
3.2.2 Cortisol.....	32
3.3 The effect of lactoferrin on Open-field test.....	34
3.3.1 Behavior test in open-field test	34
3.3.2 Motivation and location	35
3.3.3 The exploration of the novel objectives.....	40
3.3.4 The adaption to new enviroment.....	43
3.4 The effect of lactoferin to neurodevelopment.....	45
3.4.1 Neuron.....	45
3.4.2 Glial cells	46

3.4.3Imatural cells.....	48
3.4.4Neurogenesis.....	50
4 Conclusion and discussion	52
Reference.....	56

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

乳铁蛋白是一种非血液中的铁结合蛋白，是转铁蛋白家族一员。主要负责铁的转运。1961 年 Blanc 等将它们从人乳中分离获得的此种蛋白质正式命名为乳铁蛋白 (lactoferrin, LF)。Lf 在人乳中的含量特别丰富，特别在初乳中可达 7 g/L。随着乳汁的成熟其含量会有所下降，在哺乳期间为 1g/L 左右。在牛乳中含量则较低，一般仅为 0.1g/L。由于 Lf 广泛分布在不同的组织中，Lf 是一种多功能蛋白。如：对铁吸收的调节、免疫反应、抗氧化、抗癌、抗炎症反应等特性。基于乳铁蛋白在母乳中的含量的变化，脑中铁元素作为一种脑发育的重要营养，以及乳铁蛋白糖链上含有的对认知有帮助的唾液酸，我们推测乳铁蛋白作为一种人体发育中重要的营养物质，对仔猪的脑发育起到了一定的作用。

本课题研究的目的是：1) 了解乳铁蛋白对仔猪脑发育的影响；2) 分析不同剂量乳铁蛋白对仔猪产生焦虑感和探索能力方面的影响；为乳铁蛋白的营养功能提供进一步的科学依据。

本实验将 67 只仔猪分为 5 批饲养，将其根据体重和遗传背景的不同分为四组分别为：1、乳铁蛋白对照实验组，2、乳铁蛋白中剂量实验组，3、乳铁蛋白高剂量实验组（此 3 组仔猪均在生后 22 天开始进行行为学实验），4、乳铁蛋白高剂量非学习行为实验组。然后通过免疫荧光等方法对脑部发育进行检测。结合学习行为实验和目标蛋白的研究来对仔猪的神经发育进行分析比较，来揭示 Lf 对新生儿脑发育和学习认知功能的作用。

本实验研究得到结论为：1) 不同剂量乳铁蛋白对新生仔猪的体重和脑重影响在统计学上无显著性差异；2) 乳铁蛋白对仔猪的激素水平（促肾上腺皮质激素和皮质醇）没有影响；3) 不同剂量的乳铁蛋白的摄入，对仔猪在陌生环境产生的恐惧感没有影响，但是可以提高仔猪对环境的适应能力；4) 乳铁蛋白摄入量的不同对大脑海马齿状回区 (DG) 的神经细胞的组成的影响并没有观察到。

本课题研究的创新点在于，1) 突破乳铁蛋白免疫功能研究的局限，研究 Lf 在神经发育和探索行为及焦虑感产生方面的影响；2) 仔猪模型的建立，猪脑与人脑的结构形态、功能作用更为相近，由其是新生仔猪的脑发育模式更接近于人

类新生儿脑发育的模式,此模型的建立对研究早期营养对人类新生儿脑发育和预防脑损伤意义重大;3)通过认知行为表现情况进一步研究机制问题,将宏观问题通过蛋白水平上的微观实验进行更深层次的解决。4)拓宽旷场实验研究的功能性,不单单只观察仔猪的焦虑情况,还进一步研究观察其对新奇事物的探索能力,及对陌生环境适应性。

关键词: 乳铁蛋白, 仔猪, 神经发育, 旷场实验

Abstract

Lactoferrin (Lf) is an 80 kDa iron-binding glycoprotein of the transferrin family, but it does not exist in the blood. Lf was first discovered by Sorensen and Sorensen from bovine milk in 1939. The concentration of bovine milk Lf is 0.1 g/L. However, Human milk Lf is especially abundant, particularly in the colostrum reaching to 7 g/L and mature milk at concentration of 1 g/L. Milk LF has been shown to play many biological functions for health and disease prevention. It is considered to be a key component of the innate host defense system because it can respond to a variety of physiological and environmental changes, such as antifungal, antibacterial, antiviral, antiparasities. In clinic, Lf can be used as an antibiotic and antimicrobial agents for some diseases treatment. LF also plays an important role in anticancer because it can restrain the growth of tumor cells. Furthermore, Lf has the ability to function as an enzyme in some catalytic reactions. Lf can adjust the balance of iron in the body, and promote the generation and growth of the bone marrow cells. A lot of Lf rich nutrition products, are developed in the few years. One of them is LF rich infant formula. Currently LF rich products have been used to promote iron absorption and better iron status of human body.

In recent years, the research of lactoferrin mainly focused on the innate host defense system. Indeed lactoferrin was found to play a very important role in the immune system. However, it is still largely unknown if LF has a benefit on neurodevelopment. The aim of study is to investigate the functional effect and underlying molecular biochemical mechanism of lactoferrin on the brain development and cognitive function for newborn piglets fed with different doses of lactoferrin. The study may provide the first scientific evidences of benefits LF on neurodevelopment and cognitive functions and clinical applications.

67 newborn piglets were divided into 5 groups for feeding. According to the weight and genetic background, the piglets were divided into four groups including 1.

Lf high dose, 2. Lf sufficient dose, 3. control and 4. Lf high dose without learning challenge. . At day 21, the piglets from the first three groups were subjected to the learning behavior experiment. At day 38, the piglets were euthanatized, and the brain sample was collected for the further analysis. We measured cell development in the brain using the immune fluorescence assay.

In conclusions: 1) the milk with different doses lactoferrin did not affect the body weight and brain size of the newborn piglets 2) the levels of the stress hormone including ACTH and Cortisol were not different between groups, so the stress hormone was not affected by different dose lactoferrin intervention; 3) there was no significant difference in the behavior of fear to unfamiliar environment between groups., however there was significant different between groups in adaptation to the new environment. Interestingly, the piglet in the sufficient dose group had a better performance in the behavior study, suggesting no dose response for LF intervention; 4) LF supplementation did not show the benefits of neurogenesis in dentate gyrus.

Key word : lactoferrin ,open-field test, piglet, neurodevelopment

缩 写 词 表

OFT	Open-field test 旷场实验
SVZ	Subventricular zone 室管膜下区
DG	Dentate gyrus 齿状回
Lf	Lactoferrin 乳铁蛋白
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone 促肾上腺皮质激素
GRs	Glucocorticoid receptor 糖皮质激素受体
MRs	Mineralocorticoid receptor 盐皮质激素受体
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal 下丘脑-垂体-肾上腺轴
ANS	Autonomic Nervous System 自主神经系统
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone 促肾上腺皮质激素释放激素
GFAP	Glial fibrillary acidic protein 胶质纤维酸性蛋白
NeuN	Neuronal nuclei 神经核
BDNF	Brain derived neurotrophic factor 脑源性神经因子

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库